

Glikoenzim inhibitorok előállítása

T46081 sz. OTKA kutatási pályázat
Futamidő: 2004. április 1.-2007. december 31.
Támogatás: 10.2 MFt

Zárójelentés

Személyi feltételek

A kutatócsoport összetétele többször módosult: Dr. Györgydeák Zoltán 2005. tavaszi váratlan megbetegedése, majd őszi halála miatt csak az első évben, Vágvölgyiné Dr. Tóth Marietta gyermekének 2004. őszi születése, majd a két éves GYES miatt csak a futamidő mintegy 40 %-ában vett részt a munkában. Hadady Zsuzsa 2004. szeptemberétől eltávozott az egyetemről. Berzsényi Eszter tanulmányainak befejezése miatt 2005. májusában kivált a kutatócsoportból. A 2004/05. tanévben Telepő Katalin, a 2006/07. tanévben Hüse Csaba és Kónya Bálint diplomamunkásként dolgoztak a csoportban.

A kutatás célja és a vállalt munkaprogram

A szénhidrát alapú gyógyszerhatóanyagok kifejlesztésére való törekvések egyik iránya a glikoenzimek gátlószereinek megtalálása, szerkezet-hatás összefüggéseik felderítése. Ilyen gyógyszerek már ma is forgalomban vannak (pl. neuraminidázgátló: Relenza® – Zanamivir, , α -glükózidázgátlók: Glyset™ – Miglitol, Glucobay™ – Acarbose), illetve (pl. egy glükózidáz inhibitor AIDS-ellenes szerként) klinikai kipróbálás alatt állnak. A szintén szénhidrát alapú Arixtra® – Fondaparinux szintetikus heparin-helyettesítő.

A tervezett munka célja olyan szénhidrátszármazékok előállítása, amelyek bizonyos glikoenzimek (glükózidázok, amilázok, glikogén foszforilázok) gátlásával terápiás célok elérését (elsősorban a diabetes befolyásolását) tehetik lehetővé az alábbi munkaprogram szerint:

1. Előállítunk különböző *N*-glikopiranozil-*N'*-acil- vagy -aril-karbamid származékokat, melyekben változtatjuk: *a*) a cukorrészt (β -D-*glüko*, β -D-*galakto*, β -D-*xilo*, β -D-*malto*) a vegyületek GP kötőhely-specifitásának vizsgálatára; *b*) az acil- vagy az arilcsoportot a hidrofób jelleg hatásának tanulmányozására; *c*) az acil-karbamidok karbonilcsoportját szulfonilra.
2. Vizsgálatokat végzünk az acil-karbamid szerkezeti egységnek a GP gátlásához szükséges és elégséges részleteinek felderítésére.
3. Megvizsgáljuk *N*-(1-(CN, CONH₂, vagy COOR)-szubsztituált-glikozil)-karbamidok, mint GP inhibitorok előállításának lehetőségét a megfelelő 1-szubsztituált-glikozil-azidokból kiindulva.
4. Megkísérreljük a cukorrészekeken összekapcsolt glükopiranozil amidok, esetleg karbamidok előállítását D-glükózaminból dikarbonsavval végzett acilezés, anomer azidképzés, és Staudinger-reakció megfelelő sorrendben végzett kombinációjával.
5. Glikopiranozilidén-spiro-heterociklusok pl. oxatiazolok, oxadiazolok, tiazolonok, imidazolonok és szulfahidantoinok előállítását vizsgáljuk részben francia partnereinkkel együttműködésben. Ezeket a vegyületeket valamennyi említett enzimtípus gátlására megvizsgáljuk.

6. Glikopeptidomimetikumok előállítására irányuló vizsgálatokat végzünk anomer α -aminosavat tartalmazó tripeptidek szintézislehetőségeinek tanulmányozásával.
7. Biokémikus és krisztallográfus partnereinkkel együttműködésben folyamatosan vizsgáljuk az elkészült vegyületek gátló hatását glikozidáz, amiláz és glikogén foszforiláz enzimekre, valamint az enzimekhez való kötődés szerkezeti sajátosságait.

Eredmények* a munkatervi pontok szerint

1. Az *N*- β -D-glükopiranozil-karbamid típusú vegyületek részletes vizsgálatának alapja az a korábbi megfigyelésünk volt, hogy az *N*'-acetyl- és az *N*'-benzoyl származék a nyúl vázizom glikogén foszforiláz (RMGPb) mikromólos gátlószerének bizonyult,¹ illetve az *N*'-2-naftil szubsztituens jelenlétében a gátlás nanomólossá erősödött (1. Tábl. 1, 9 és 6).

Az új származékokat úgy terveztük meg, hogy az acil-karbamid változatos gyűrűket, illetve különbözőképpen helyettesített benzoylcsoportokat tartalmazzon^{2, 3} (1. Tábl. 2-8, ill. 9-17). A **6** (R = Ac, R' = acil, X = O) vegyületek előállítására elsőként a védett glükopiranozil-azidból (**4**) Pintér módszere⁴ szerint készíthető **8** (R = Ac) karbamid Lewis-sav katalizált acilezését⁵ alkalmaztuk. Ennek során igen gyakran mindkét anomer képződését tapasztaltuk,⁶ ami – a szinte teljesen azonos kromatográfiás mobilitás miatt – jelentősen megnehezítette a kívánt β -anomerek izolálását. Ennek elkerülésére előállítottuk a vegyületeket a **4**→**1**→**6**, illetve az *in situ* készített glikozil-izocianáton keresztül haladó **4**→**1**→**2**→**6** utakon is, azonban az anomerizációt így sem sikerült elkerülnünk.⁶ További gondot jelentett a védőcsoportok eltávolítása: a szokásos Zemplén körülmények között igen rövid reakcióidő alatt is az *N*'-acil csoport lehasadását tapasztaltuk a **8** (R = H) karbamid képződése mellett; savkatalizált átészterezési körülmények között ez a reakció jelentősen lelassult, ami lehetővé tette a kívánt, nem védett **6** karbamidok izolálását, azonban a **8** (R = H) karbamid továbbra is jelen volt a reakcióelegyekben.

E problémák elkerülésére a D-glükózból (**10**) kiváló hozammal készíthető glükozilamin-karbamátot^{7, 8} alakítottuk át a **6** (R = H, R' = acil, X = O) acil-karbamidokká. Ezen az úton számos *N*-szubsztituált karbamid és -tiokarbamid, illetve egy szelenokarbamid származékot **6** (R = H, R' = aril, aralkil, X = O, S, Se) is elkészítettünk.⁶ Karbamidok és tiokarbamidok készítésére alkalmaztuk a **4**→**1**→**6**, **4**→**5**→**6** és **4**→**1**→**2**→**6** utakat is a megfelelő izo(tio)cianátokat, illetve aminokat használva reagensként.

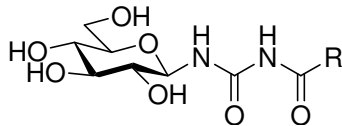
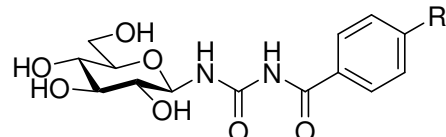
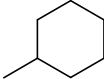
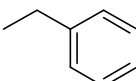
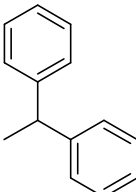
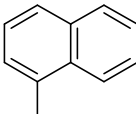
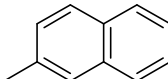
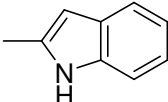
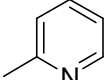
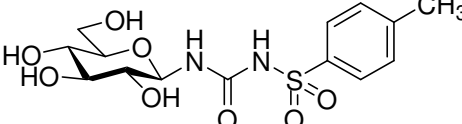
A fenti utakon előállított nem védett acil-karbamidok, illetve a **4**→**1**→**6** úton előállított szulfonilkarbamid enzimkinetikai vizsgálatának eredményei az 1. Táblázatban találhatók. Ennek alapján megállapítható, hogy az acil részben nagyméretű, megfelelő orientációjú homoaromás csoport jelenléte eredményezi a legerősebb kötődést az enzimhez, míg a benzoylcsoport para-helyettesítői közül a nagyméretű és/vagy hidrofób alifás csoportok előnyösek. A karbonilcsoport cseréje szulfonilra a gátló hatás elvesztésével jár.

Az enzim–inhibitor komplexek röntgenkrisztallográfiás vizsgálata során fény derült arra, hogy a benzoyl-karbamid (1. Tábl. 9) kötődik a GP új allosztérikus helyéhez is.¹ Ezt a kötődéstípust a 2-naftoil-karbamid (1. Tábl. 6), és az *N*-(β -D-glükopiranozil)-2-naftoesavamid esetében is tapasztaltuk. Mivel az enzim aktív helye, ahol a glükózszármazékok

* A végzett munka egy részét nemzetközi folyóiratokban közzétettük. Ezek a közlemények tartalmazzák az adott téma kutatásának előzményeit, és az elért új eredmények részletes bemutatását. Ezekre a folyóiratcikkek az irodalomjegyzékben hivatkozunk, amely tartalmazza az előkészületben lévő kéziratokat is. Ez utóbiak tartalmát a zárójelentésben kifejtjük, míg az előbbieket csak összefoglalásszerűen említjük.

kötődnek, specifikus a D-glüko konfigurációra, ettől eltérő konfigurációjú vegyületektől az új allosztérikus helyen való szelektív kötődést reméltünk (ld. a 4. pontot is). Ennek vizsgálatára D-galakto és D-xilo konfigurációban előállítottuk az 1. ábra 8 típusú karbamidjait, majd ezekből a 6 típusú benzoil-származékokat, valamint a 4 típusú azidokból az N-(β-D-galaktopiranozil)- és -(β-D-xilopiranozil)-2-naftoesavamidokat.¹⁰ Az utóbbi amidok röntgenkristallográfiás vizsgálata valóban mutatta a kötődést az új allosztérikus helyhez (a benzoil-karbamidok vizsgálata még nem fejeződött be).

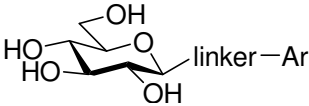
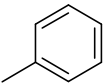
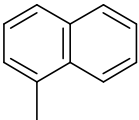
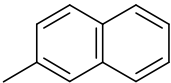
1. Táblázat: N-acil-N'-β-D-glükopiranozil-karbamidok gátló hatása nyúl vázizom glikogén foszforiláz *b* (RMGP*b*) enzimre

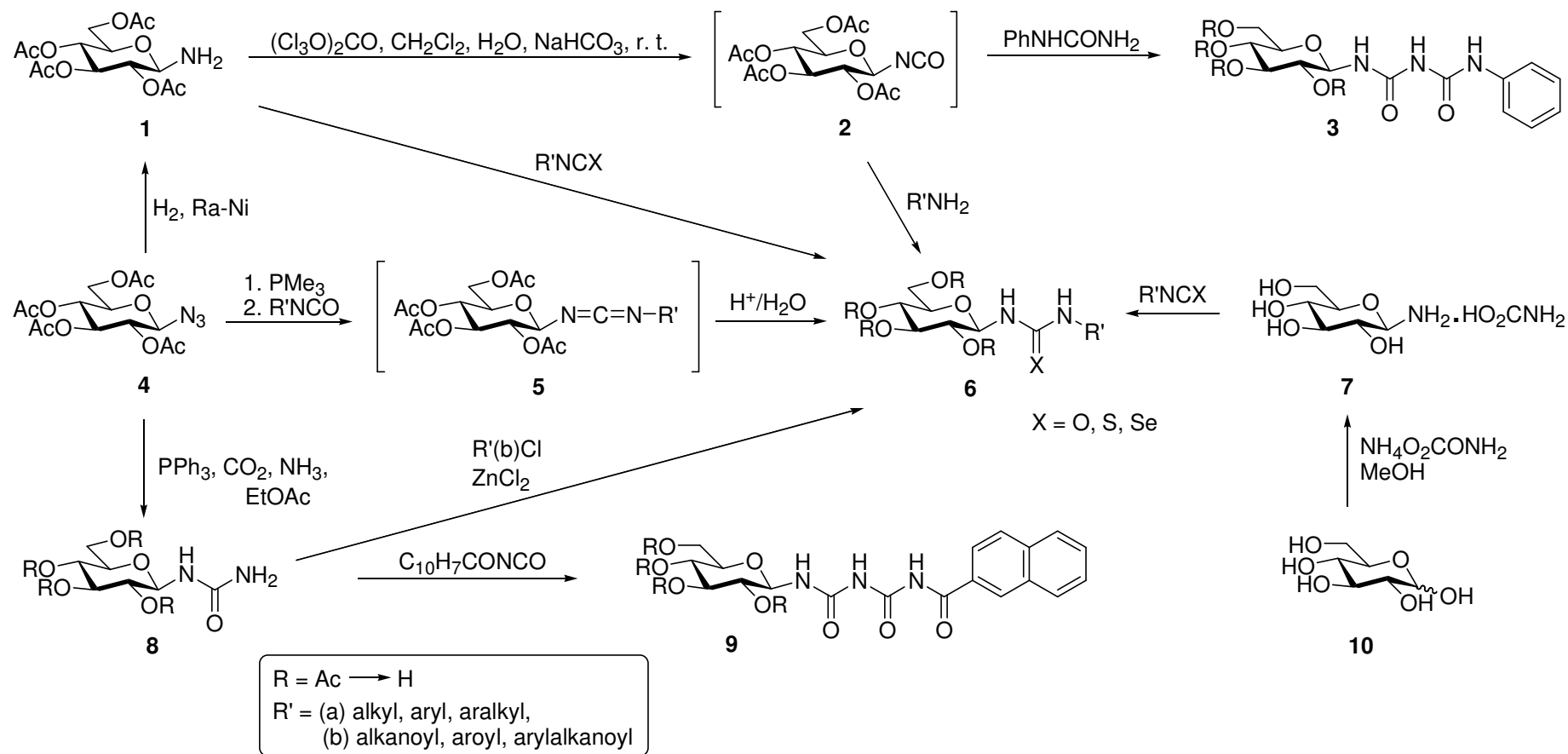
									
En-try	R	K_i [μM]	IC ₅₀ [μM]	Ref.	En-try	R	K_i [μM]	Ref.	
1.	-CH ₃	305		1	9.	-H	4.6	1	
2.			5000	3	10.	-CH ₃	2.3	2	
3.			10000	9	11.	-CF ₃	0.6	3	
4.			>5000	9	12.	-C(CH ₃) ₃	0.3	3	
5.		15		3	13.	-C ₆ H ₅	3.7	2	
6.		0.35		3	14.	-NO ₂	3.3	2	
7.		4.0		3	15.	-NH ₂	6.0	2	
8.		68		3	16.	-OH	6.3	2	
18.					17.	-Cl	4.4	2	
					nem gátol				

E vizsgálatok során arra is fény derült, hogy az anomer centrum β -NH szubsztituense nincs H-híd kötésben az enzimen a His377 főlánc-karboniljával. A korábban vizsgált β -D-glükopiranozilamin származék inhibitorok esetén ez a H-híd invariánsan mindig jelen volt, így az a felismerés, hogy ennek hiányában is kialakulhat erős kötődés, az inhibitor-tervezésnek új irányt adott (ld. az 5. pontot).

- Az acil-karbamidokban a hatékony gátláshoz szükséges és elégséges elemek azonosítására elsőként a cukor és az aromás rész közötti „linker” hosszúságának megállapítására végeztünk vizsgálatokat. Az 1. ábrán vázolt reakcióutakon a **6** típusú ($R = H$, $R' = \text{aril}$, $X = O$) karbamidok mellett elkészítettük a hosszabb láncot tartalmazó **3** és **9** biuret származékokat. Ezek hatékonyságának összevetése (a korábbi vizsgálatokból ismert amidokkal is) azt mutatta, hogy a 4 atomos kapcsoló elem esetén a legjobb a gátló hatás (2. Tábl. 1-3, 8-10).

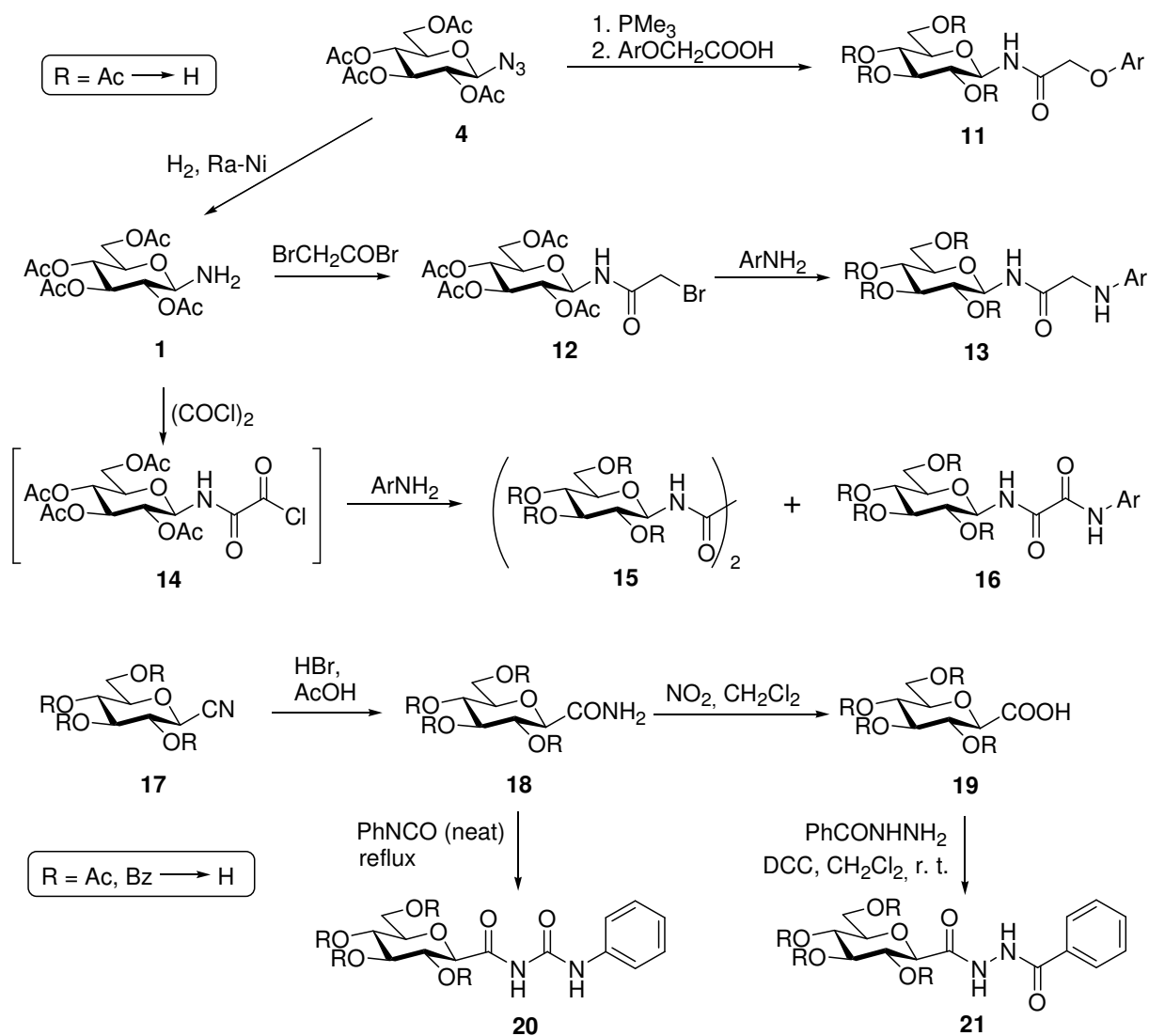
2. Táblázat: A cukor és az aromás rész közötti kapcsoló elem (linker) hatása az RMGPb gátlására (K_i [μM])

		Ar		
	linker			
1.	NHCO	81^{11} 144^{12}	444^{13}	10^{13}
2.	NHCONH	18^9	$350 (\text{IC}_{50})^9$	$15 (\text{IC}_{50})^9$
3.	NHCONHCO	4.6^1	10^3	0.35^3
4.	NHCONHCH ₂	$\sim 750^9$	-	-
5.	NHCOCH=CH	18^{13}	-	3.5^{13}
6.	NHCOCH ₂ O	34^{14}	-	-
7.	NHCOCH ₂ NH	70^{14}	-	142^{14}
8.	NHCONHCONH	$\text{IC}_{50} 75 \mu\text{M}$	-	-
9.	NHCONHCOCH ₂	600^9	-	-
10.	NHCONHCONHCO	-	-	45% $(625 \mu\text{M})^9$



1. ábra: Glükopiranozil-karbamidok és analóg vegyületek szintézise

A következőkben az NHCONHCO rész elemeinek helyettesíthetőségét vizsgáltuk. Ennek érdekében a **4** azidokból foszfinimin köztiterméken át ariloxiacetamidokat (**11**) készítettünk.¹⁴ Mivel az analóg reakció *N*-fenil-glicinnel nem vezetett eredményre, a **13** arilaminoacetamidokat a **4**→**1**→**12**→**13** kerülő úton készítettük el.¹⁴ Az enzimkinetikai vizsgálatok alapján (2. Tábl. 4-7) megállapítható, hogy az acil-karbamid rész elemeinek cseréje a gátlás romlásához vezet, tehát a teljes NHCONHCO kapcsoló rész jelenléte elengedhetetlen a hatékony inhibícióhoz.

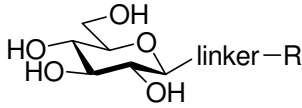
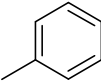
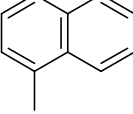
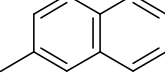
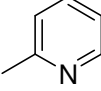
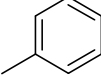


2. ábra: Szintézisek az acil-karbamid lánc elemeinek helyettesítésére és felcserélésére

Megvizsgáltuk azt is, hogyan hat az acil-karbamid rész elemeinek felcserélése a gátlásra. Az **1** glükózilamint *in situ* oxalamoil-kloriddá (**14**) alakítottuk, majd egy második, aromás aminnal a **16** oxamidokat kaptunk minden esetben a **15** *N,N'*-bisz-(β -D-glükopiranozil)-oxamiddal együtt. További permutációkat kaptunk a **17** glükopiranozil-cianidból kiindulva: a **18** amidon át a **20** „fordított” benzoil-karbamidot kaptuk, míg a **19** anhidro-aldotsavból a **21** aszimmetrikus diacil-hidrazinhoz jutottunk. A nem védett származékok enzimgátló sajátságainak összevetése (3. Tábl.) alapján megállapíthatjuk, hogy a 4 atomos linker elemeinek felcserélése a gátlás gyengüléséhez vezet: az oxamidok mintegy 1-2

nagyságrenddel rosszabb inhibitorok, más permutációk esetén viszont teljesen megszűnik a gátló hatás.¹⁵

3. Táblázat: Az acil-karbamid rész elemeinek felcserélése és ennek hatása az RMGPb gátlására

								
Entry	Linker	K_i [μ M]	Ref.	R	Entry	Linker	K_i [μ M]	Ref.
1.	NHCONHCO	4.6	¹		6.	NHCOCONH	100	¹⁵
2.	NHCONHCO	15.2	³		7.	NHCOCONH	144	¹⁵
3.	NHCONHCO	0.35	³		8.	NHCOCONH	56	¹⁵
4.	NHCONHCO	68	³		9.	NHCOCONH	230	¹⁵
5.	CONHCONH	no inh.	¹⁵		10.	CONHNHCO	22 % at 3.75 mM	¹⁵

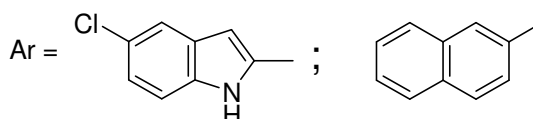
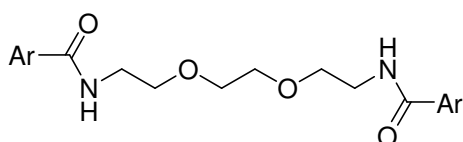
3. Az 1-szubsztituált glükopiranozil-karbamidok előállításának célja az volt, hogy információkat nyerjünk az anomer centrumon bifunkciós származékok esetén elsősorban a karboxamido csoport jelenlétének hatására (az α -karboxamido csoport erősítette a gátlást az irodalomból ismert vegyületek^{16, 17} esetén: β -NHCOOMe- α -CONH₂ – K_i = 16 μ M, β -NHCOOMe- α -H – K_i = 86 μ M).

Előkísérletekként a megfelelő per-*O*-benzoilezett 2-azido-2-dezoxi- β -D-glüko-hept-2-ulopiranozonsav metilészterből és -amidból új glükózszármazékokat állítottunk elő, amelyek bifunkciós anomer centrumán N₃-COOMe (nincs gátlás), N₃-CONH₂ (K_i = 1.8 mM), N₃-CONHCH₂COOMe (nincs gátlás), és NHCOMe-CONH₂ (K_i = 310 μ M), szubsztituenspárok találhatók.¹⁸ E vegyületek csak mérsékelt gátló hatást mutattak a nyúl vázizomból izolált glikogén foszforiláz enzimmel szemben, a karboxamido csoport hatása pedig a másik szubsztituenstől függően változik.

Az 1-karboxamido-szubsztituált glükózil-karbamidok elkészítésére a D-glükózból hat lépésben nyerhető per-*O*-benzoilezett 2-azido-2-dezoxi- β -D-glüko-hept-2-ulopiranozonsavamidból indultunk ki. Katalitikus redukcióval elkészítettük a megfelelő 2-amino származékot, amelyet anomer keverék formájában kaptunk meg.¹⁸ Az egyensúlyi vizsgálat azt mutatta, hogy az axiális aminocsoportot tartalmazó anomer a fő komponens, amelyet kristályos formában izolálni is tudtunk. Ennek a reakciója fenil-izocianáttal sok komponensű, elválaszthatatlan termékkeveréket adott, ezért ezeket a reakciókat nem tanulmányoztuk tovább.

A karbamid rész kialakítására az 1. ábrán alkalmazott **4**→**5**→**6** átalakítások a karboxamido csoport jelenlétében főleg gyűrűzáráshoz vezettek, karbamid származékot csak egy esetben tudtunk izolálni (részletesebben ld. az 5. pontban).

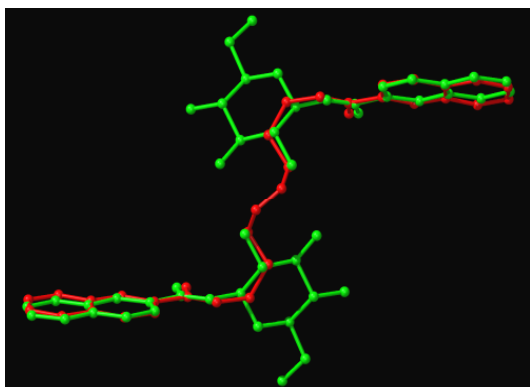
4. Az új allosztérikus helyen – mely az enzim nem kovalensen kötött alegységei között elhelyezkedő üregben található – eddig különböző klórindol-karboxamid származékok kötődését figyelték meg.¹⁹ A hely C2 szimmetriájának megfelelően az egyik legjobb ilyen inhibitor a szintén C2 szimmetriájú CP526423.²⁰



CP526423

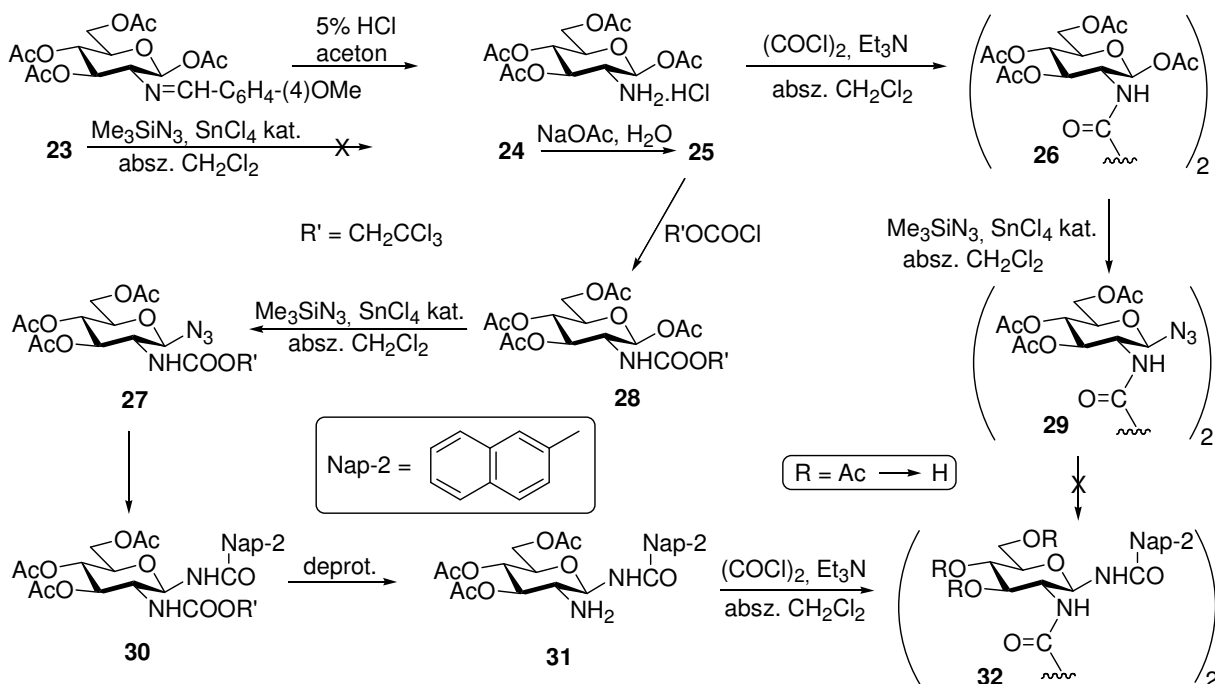
IC₅₀ = 6 nM, emberi máj GP

22



Elkészítettük e vegyület 2-naftil analógját (**22**), mivel egyes glükózszármazékok megfigyelt kötődése az új allosztérikus helyen (ld. az 1. pontot) felvetette a klórindol rész egyszerűsítésének lehetőségét. A **22** vegyület a kristallográfiai vizsgálatok szerint szintén kimutatható ezen a kötőhelyen, azonban igen rossz oldhatósága a részletesebb vizsgálatokat nem tette lehetővé. Az *N*-(β-D-glükopiranozil)-2-naftoesavamid és **22** ezen a helyen megismert kötődési módjainak szuperpozíciója (ld. az

ábrán) alapján a két cukorgyűrű összekötése a 2-es pozíciókban egy jobb oldhatóságú, és hasonló kötődésű származék előállításának lehetőségét vetette fel. A modell alapján a 2-es szénatomok közé egy négy atomos kapcsoló elem beiktatása tűnt célszerűnek.

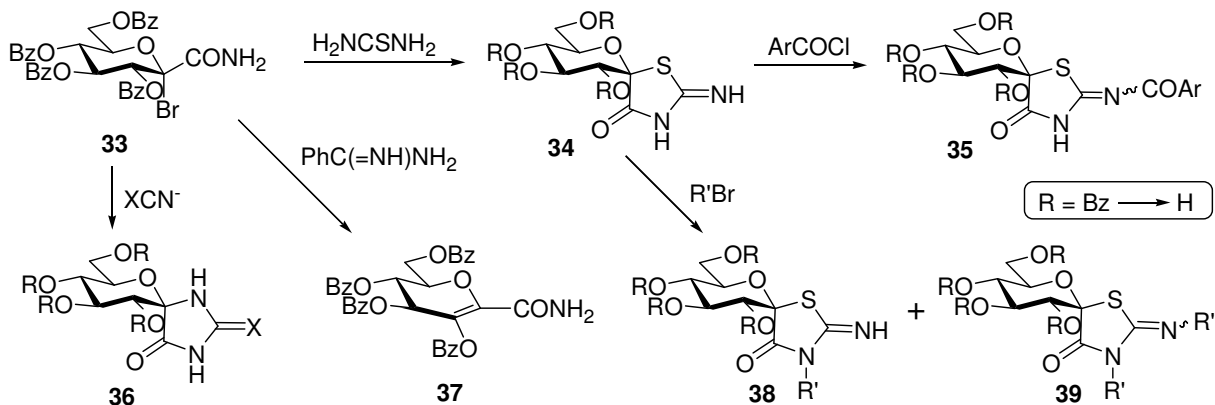


3. ábra: „Dimer” glikozilamidok előállítása

A per-*O*-acetilezett D-glükózamin nitrogénen szokásosan védett származékából (**23**) az azidképzés sikertelen volt, ezért a **25** amint oxalileztük, majd elkészítettük a **29** azidot. Ennek Staudinger típusú átalakítása a kívánt amiddá (Ph_3P , Bu_3P , Me_3P illetve 2-naftoesav vagy 2-naftoil-klorid alkalmazásával) nem volt eredményes. A megfelelő glikozilamin *N*-acilezése érdekében megkíséreltük **29** redukcióját, azonban ez katalitikus hidrogénezési körülmények között (Raney-Ni, Pd/C) nem reagált. Ezért kénytelenek voltunk kerülő utat megvizsgálni, és a 2- NH_2 csoportot az amid mellett szelektíven hasítható csoporttal védeni. Az általunk e pályázat keretében kidolgozott új triklóretil hasítás²¹ (ld. a 6. pontot) további kipróbálására kiindulási anyagként a 2,2,2-triklóretil-karbamátként védett azidot (**27**) választottuk, és alakítjuk át a célvegyületté (az utolsó két reakciólépés **30**→**31**→**32** megvalósítása a jelentés írásakor még nem fejeződött be).

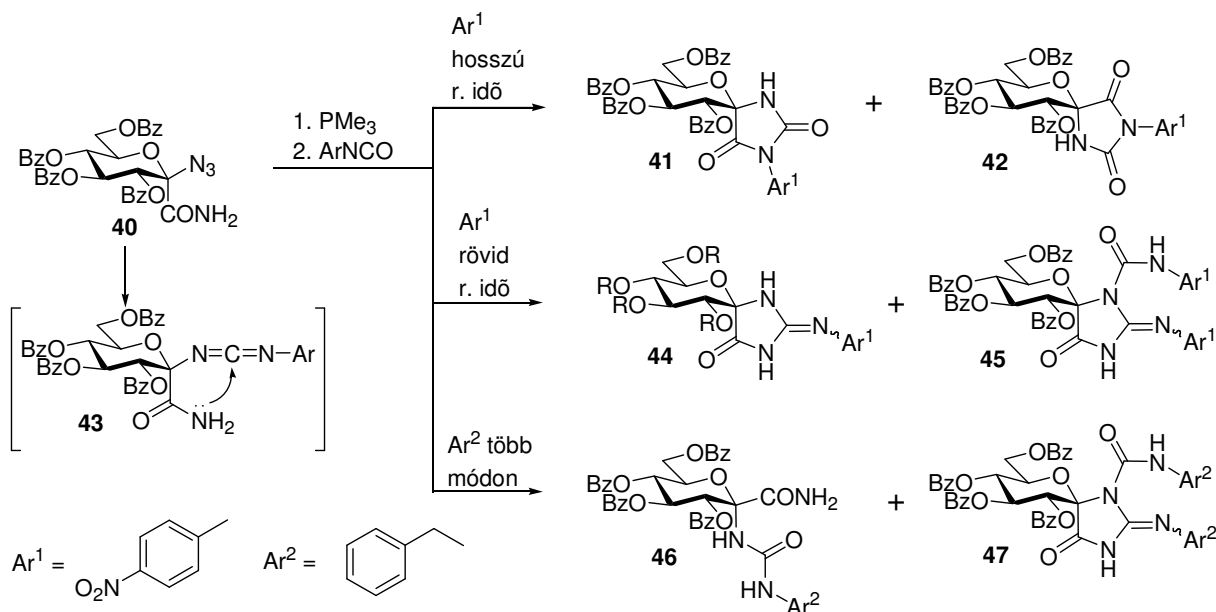
5. A glikogén foszforiláz első mikromólos gátlószerei a **36** ($\text{X} = \text{O}, \text{S}$) glükopiranozilidén-spiro-(tio)hidantoinok voltak.^{12, 22-24} A fehérje-krisztallográfiai vizsgálatok e vegyületekben is az anomer centrum β -NH szubsztituensének H-kötés donor szerepét erősítették meg.^{25, 26} Az acil-karbamidokkal nyert tapasztalatok alapján – melyek szerint erős kötődés e H-híd hiányában is kialakulhat – olyan spiro-származékokat állítottunk elő, amelyekben ez a H-kötés szerkezeti okok miatt nem jöhet létre.

Glükopiranozilidén-spiro-tiazolonok. A **33** (ulopiranozilbromid)onsavamid származék tiokarbamidral a **34** spiro-tiazolonná alakult. Ennek acilezése szelektíven a **35** származékokat adta, míg alkil-bromidokkal bázis jelenlétében végzett alkilezése főleg az amid nitrogénen ment végbe ($\text{R}' = \text{Me}$: 62 % **38**; $\text{R}' = \text{allil}$: 24 % **38** + 26 % **39**; $\text{R}' = \text{Bn}$: 26 % **38** + 24 % **39**). A **34** és **35** vegyületekkel eddig elkészült enzimkinetikai eredmények alapján (**34** ($\text{R} = \text{H}$), $\text{K}_i = 14 \mu\text{M}$; **35** ($\text{R} = \text{H}$) $\text{Ar} = \text{Ph}$, $\text{K}_i = 9 \mu\text{M}$; $\text{Ar} = 1$ -naftil, $\text{K}_i = 8 \mu\text{M}$; $\text{Ar} = 2$ -naftil, $\text{K}_i = 4 \mu\text{M}$) ez a vegyülettípus igazolta a tervezési szempontot, és további képviselőinek előállítása folyamatban van.



4. ábra: Glükopiranozilidén-spiro-tiazolonok előállítása és reakcióik

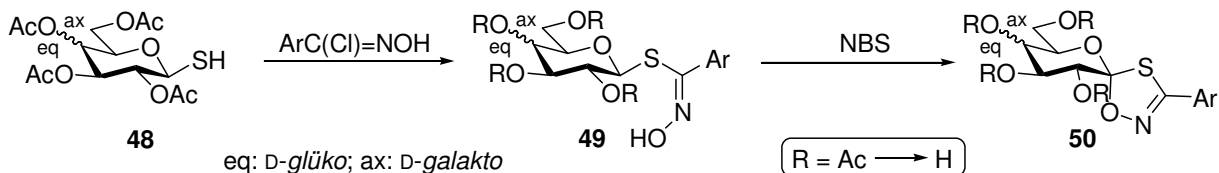
Glükopiranozilidén-spiro-imidazolonok. A tiazolonokkal analóg, de a β -NH csoportot is tartalmazó imidazolonok előállítását kíséreltük meg **33**-ból benzamidinnel, azonban a kívánt gyűrűzárás helyett csak a **37** eliminációs terméket kaptuk meg.



5. ábra: Glükopiranozilidén-spiro-imidazonok előállítása

Imidazon típusú vegyületek előállítására vizsgált másik lehetőség a **40** (ulopiranozil-azid)onsavamid származék Staudinger eljárással végzett *in situ* átalakítása egy karbodiimid típusú közttermékké (**43**), amely gyűrűt zárhat a várt termék keletkezése irányában. E reakciók végrehajtásakor minden esetben bonyolult termékelegyet kaptunk, amelyekből nem sikerült valamennyi képződött vegyületet elkülöníteni. Ha a foszfinimint rövid (~15 perc) reakcióidő alatt képeztük, és 4-nitrofenil-izocianáttal reagáltattuk, a várt **44** imidazont és annak izocianát addíciós származékát (**45**) tudtuk izolálni. Hosszú idejű (6-8 nap) foszfiniminképzés után a **41** és **42** *N*-szubsztituált hidantoinokat kaptuk (melyek keletkezéséhez a **43** karbodiimid karbamiddá hidratálódását tételeztük fel). Benzil-izocianát alkalmazásakor többféle oldószer és hőmérséklet kipróbálása is a **46** és **47** vegyületeket szolgáltatva eltérő arányban.

Glikopiranozilidén-spiro-oxatiazolok. Ezeket a vegyületeket *D*-glükó²⁷ és *D*-galakto²⁸ konfigurációban állítottuk elő a megfelelő védett 1-tio-aldopiranozból (**48**) arilhidroximóil-kloriddal végzett tiohidroximát (**49**) képzéssel, és ezt követő oxidatív gyűrűzárással (**50**). A védőcsoportok konvencionális eltávolítása után kaptuk az enzimológiai vizsgálatokra alkalmas vegyületeket.

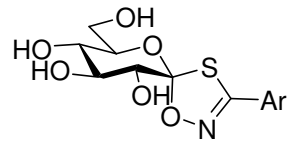


6. ábra: Glikopiranozilidén-spiro-oxatiazolok előállítása

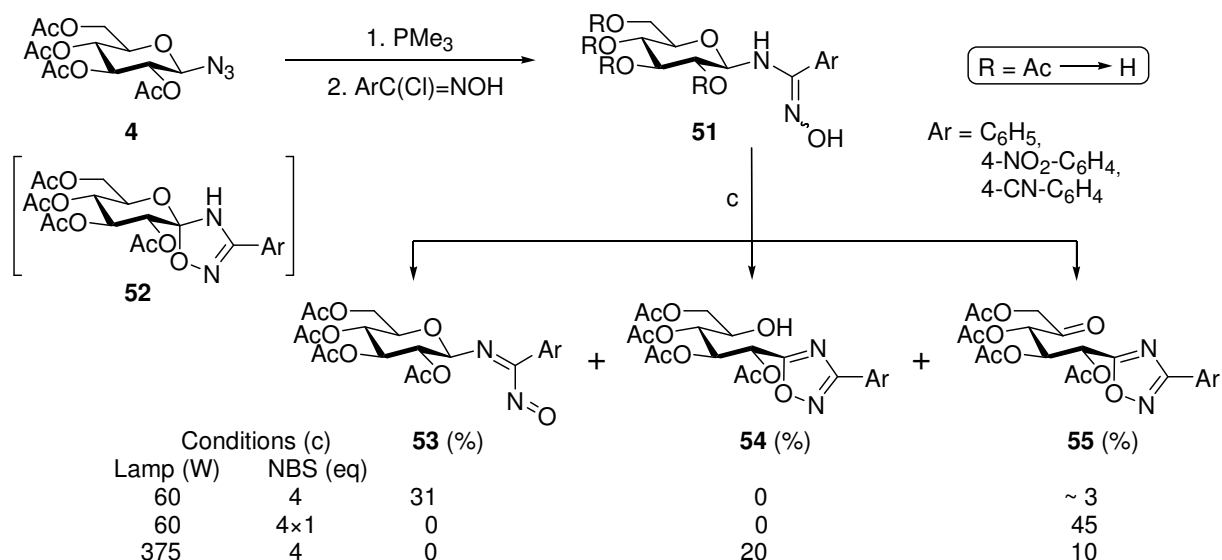
A *D*-galakto konfigurációjú származékokat *E. coli* *D*-galaktozidázzal szemben vizsgáltuk: mind a tiohidroximátok, mind a spiro-oxatiazolok gyenge gátlószereknek bizonyultak ($K_i = 1\text{-}10\text{ mM}$).²⁸

A D-glüko konfigurációjú vegyületek tervezésekor az 1. pontban részletesen leírt acil-karbamidokat tekintettük irányadónak, amennyiben az ott hatásosnak bizonyult szubsztituenseket alkalmaztuk a spiro-oxatiazol gyűrű helyettesítőiként. A tiohidroximátok nem mutattak gátlást a nyúl vázizom glikogén foszforilázzal szemben, de a spiro vegyületek között több a mikromólos tartományban, míg a 2-naftil származék a nanomólos tartományban gátolta az enzimet (4. Tábl.).²⁷

4. Táblázat: A glükopiranozilidén-spiro-oxatiazolok gátló hatása az RMGPb enzimre

		Ar						
		Ph	<i>p</i> -NO ₂ Ph	<i>p</i> -CNPh	<i>p</i> -FPh	<i>p</i> -OMePh	<i>p</i> -PhPh	2-Naphthyl
Inhibíció	<i>K_i</i>	26			48	8.2		0.16
[μM]	IC ₅₀		250	700			250	

Glükopiranozilidén-spiro-oxadiazolok. A spiro-oxatiazolokkal párhuzamosan vizsgáltuk a megfelelő oxadiazolinok (**52**) előállítását is, amelyekben az anomer centrumhoz kapcsolódó β-NH az említett módon hozzájárulhat az erős kötődéshez. Számos reakcióutat megvizsgálva a **4** azidból módosított Staudinger módszerrel tudtuk előállítani az oxidatív ciklizációra alkalmas **51** amidoximokat. A különböző körülmények között megkísérelt gyűrűzárás során **51**-ből (Ar = 4-NO₂-C₆H₄) összetett termékkeveréket kaptunk, melynek komponenseit azonosítva nem találtuk meg a várt terméket. A fő termékek részlegesen *O*-acetilezett 5-polihidroxiálkil-2-(4-nitrofenil)-1,2,4-oxadiazolnak (**54**), illetve oxidált származékának (**55**) bizonyultak, amit a heterogyűrű aromatiszációjának érdekében bekövetkező cukorgyűrű-felnyílással értelmeztünk.²⁷



7. ábra: Glükopiranozilidén-spiro-oxadiazolinok előállítására végzett kísérletek

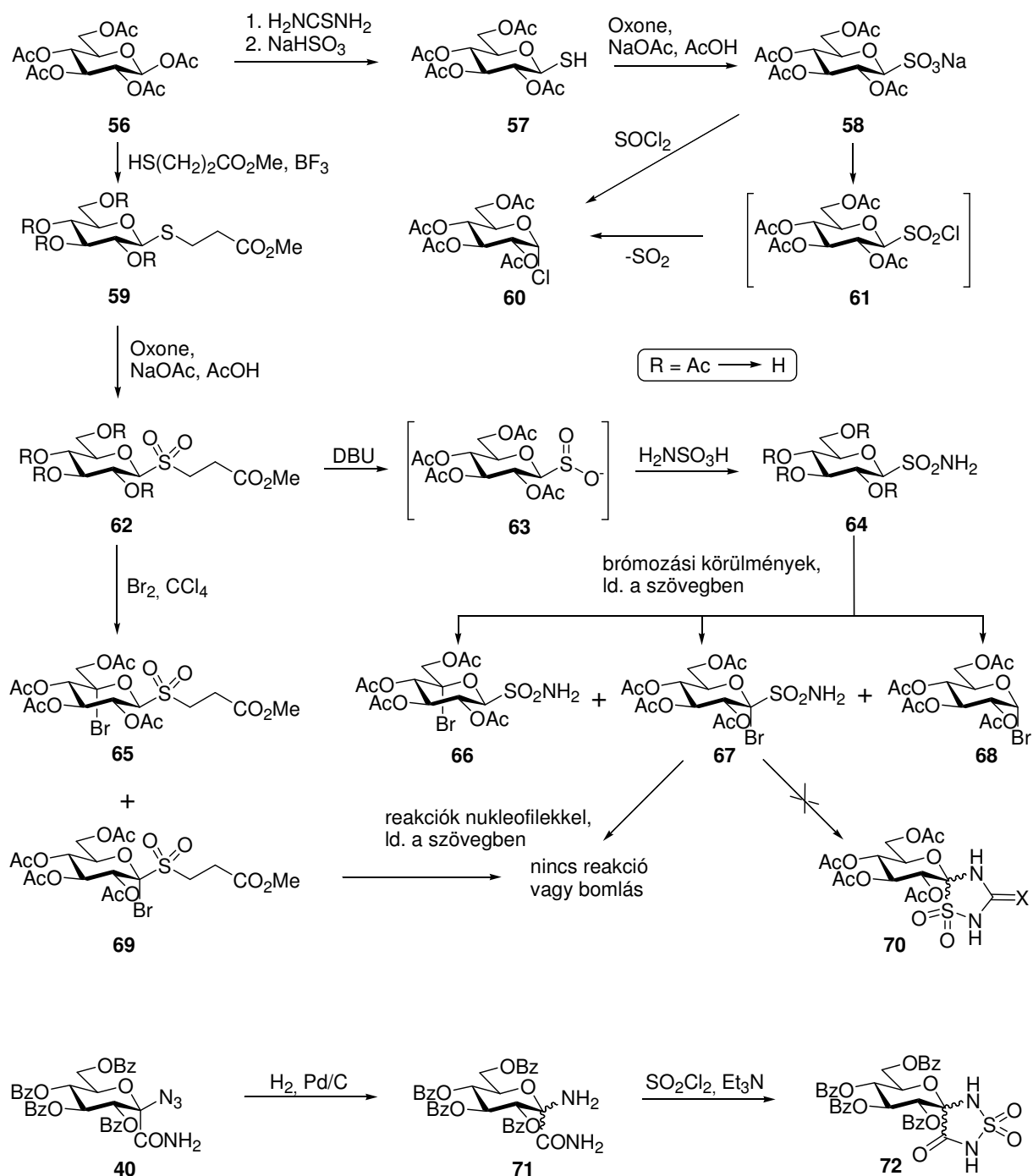
Glükopiranozilidén-spiro-szulfahidantoinok. A glikogén foszforiláz enzimek gátlószereinek tervezéséhez néhány esetben számítási kémiai módszereket is publikáltak.²⁹ Ennek alapján érdekesnek tűnt egyes inhibitorok szerkezetében karbonil→szulfonil cserét végezni.

A β -D-glükopiranozil-szulfonamid (**64**) előállítását elsőként az 1-tio- β -D-glükopiranozból (**57**) oxidációval nyerhető szulfonátsóból (**58**) kíséreltük meg, azonban számos próbálkozás ellenére sem sikerült a megfelelő savkloridhoz (**61**) jutnunk. A savklorid jelenlétét feltételező, nitrogén nukleofilek jelenlétében végzett próbálkozások is eredménytelenek maradtak. Egy, a munkánk közben megjelent közlemény megerősítette, hogy a **61** szulfonilkloridok igen bomlékonyak, kéndioxid veszteséssel a megfelelő glikozil-kloriddá (**60**) alakulnak.³⁰ A **64** szulfonamidot más úton, az **59** tioglikozid oxidációját (**62**) követő β -eliminációval nyerhető szulfinátsóból (**63**) állítottuk elő.

A **36** spiro-hidantoinokkal analóg szulfahidantoinok egyik regioizomerjének (**70**) elkészítése érdekében a **64** szulfonamidot gyökösen brómoztuk. A várt 1-bróm származék (**67**) mellett az 5-bróm vegyület (**66**) is keletkezett, ami egyes irodalmi tapasztalatok³¹ alapján várható volt. Váratlan volt viszont az acetobrómglikóz (**68**) keletkezése, amely valamennyi kísérlet (Br_2 , CHCl_3 , K_2CO_3 , hv, reflux; NBS, Bz_2O_2 , CCl_4 , reflux; Br_2 , K_2CO_3 , PhCF_3 , hv, reflux) során főterméknek bizonyult. Ennek elkerülésére vizsgáltuk az **59** tioglikozid és a **62** szulfon brómozását. Az **59** tioglikozid esetén bomlás történt, míg a **62** szulfonból az 1-bróm- (**69**) és az 5-bróm (**65**) származékokat izoláltuk. Az 1-bróm-szulfonból megkísérelt β -elimináció több terméket adott, melyek közül egyet sem sikerült tiszta formában elkülöníteni. A nem tiszta frakciók NMR spektruma alapján valószínűsíthető, hogy a reakció fő iránya az oldallánc lehasadása helyett a HBr elimináció a cukorgyűrű 1,2-pozícióiból.

A **67** 1-brómglikozil-szulfonamidot a **36** spiro-tiohidantoin előállításának körülményei között reagáltattuk, azonban nem tapasztaltunk átalakulást (NH_4SCN vagy AgSCN , CH_3NO_2 , 80 °C vagy reflux, DMF reflux). A **67** és **69** megkísérelt azidszubsztitúciós reakciókban (NaN_3 vagy LiN_3 , vagy $\text{Me}_3\text{SiN}_3/\text{AgOTf}$ DMF-ben vagy acetonban szobahő vagy refluxhőmérsékleten) is hasonló észleleteink voltak.

A spiro-szulfahidantoin másik regioizomerje elkészítésének lehetőségét a **40** (ulopiranozil-azid)onsavamidból kiindulva vizsgáltuk. Ennek redukciója aminkeveréket (**71**) szolgáltatott, melynek reakciója szulfonil-kloriddal a várt tömegű vegyületet (**72**) adta, azonban a spiro-konfiguráció egyértelmű meghatározása a rendelkezésre álló csekély termékmennyiség miatt eddig nem készült el.



8. ábra: Glükopiranozilidén-spiro-szulfahidantoinok előállítására végzett kísérletek

6. Korábbi munkáink során számos glikopeptidomimetikum prekuzornak tekinthető (ulopiranozilazid)onsav-^{32, 33} és más³⁴ származékot állítottunk elő. Jelen vizsgálataink arra irányultak, hogy ezeket hogyan alkalmazhatjuk olyan tripeptidek előállítására, melyek az anomer α -aminosavat közepén tartalmazzák, és amelyek standard peptidkémiai védőcsoport manipulációs és kapcsolási módszerekkel továbbalakíthatók.

A szintézislehetőségek tanulmányozása során cink por és *N*-metilimidazol etil-acetátban való alkalmazásával új módszert dolgoztunk ki 2,2,2-triklóretil-alapú védőcsoportok (észterek, karbonátok, karbamátok) szelektív eltávolítására redukálható (azid, nitro, szén-

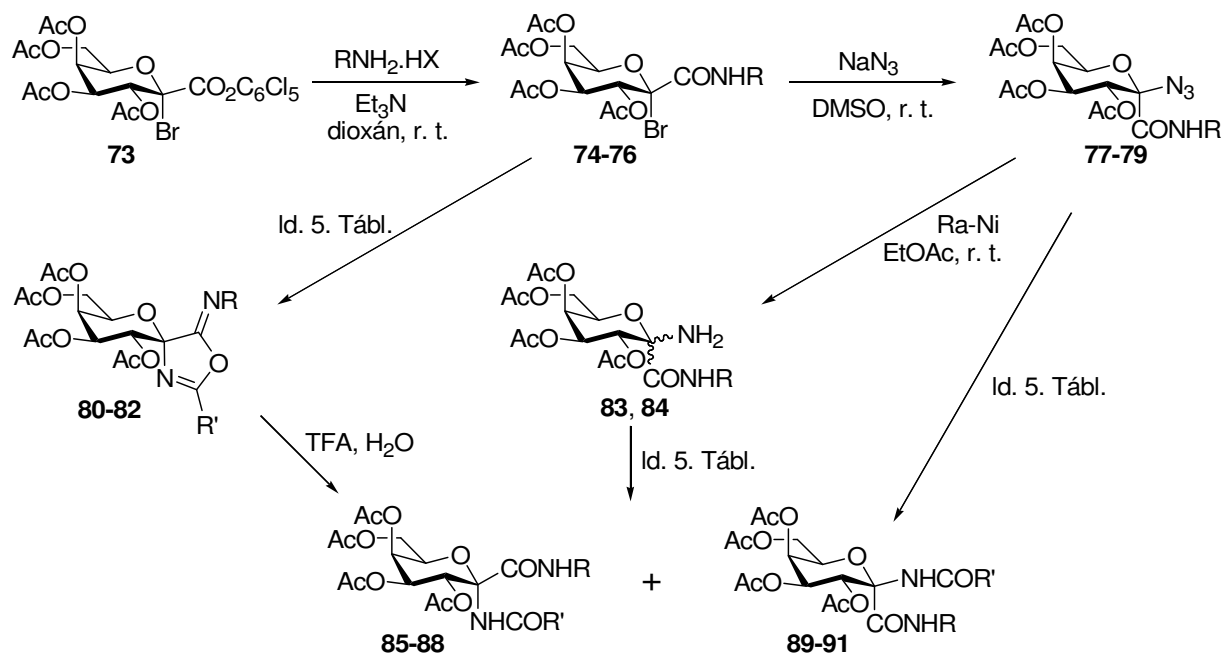
szén kettős kötés, fenacil), illetve savérzékeny (*terc*-butil) funkciós- és védőcsoportok jelenlétében.²¹

A D-galaktózból 6 lépésben elkészíthető **73** brómozott aktívészterből aminosav származékokkal a **74-76** amidokat, majd ezekből azidszubsztitúcióval a **77-79** azido „dipeptideket” állítottuk elő (9. ábra; 5. Tábl.). A **77** és **78** glicinamid redukciójával kaptuk a **83** és **84** dipeptideket anomer keverék formájában, amelyekben az α -NH₂ származék volt túlsúlyban, illetve ezeket kristályosítással izolálni is lehetett. A **83** acetilezésével kapott elegyből mindkét anomer dipeptidet (**93** és **97**) el tudtuk különíteni. Az aminosavkeverékek további, DCC-vel végzett acilezési reakcióelegyeiből csak az **86** és **87** axiális amidokat izoláltuk. A **77** azido-glicinamid Staudinger módszerrel végzett reakciójában az acetilezőszertől függően eltérő termékarányokat (**93** és **97**) figyeltünk meg.

A di- illetve tripeptidek sztereoselektív előállítására vizsgáltuk **74-76** Ritter-reakcióját, amely korábbi tapasztalataink³⁴ szerint nem helyettesített amidokkal (pl. **74** R = H) axiális nitrilbeépülést mutatott. A **74-76** vegyületekből kiindulva a **80-82** spiro-oxazolinokat kaptuk, melyek savkatalizált hidrolitikus gyűrűnyitása a **85**, **86** és **88** di- és tripeptideket adta.

Az ellentett konfigurációjú peptidek előállítására a **77** és **78** azidokat Staudinger módszerrel a megfelelő védett aminosavval reagáltattuk, és a **90** és **91** származékokat izoláltuk.

A tripeptidek anomer konfigurációjának bizonyítása – az oldalláncok mozgékonyasága miatt – NMR módszerekkel nem volt teljesen egyértelmű, ezért további vizsgálatok, elsősorban CD mérések és molekulamodellezés szükségesek, illetve folyamatban vannak. Az itt megadott konfigurációk az alkalmazott reakciók ismert szelektivitási viszonyain, illetve a piranózgyűrűk vázprotonjai kémiai eltolódásainak korrelációján alapulnak.



9. ábra: Anomer α -aminosav tartalmú di- és tripeptidek előállítása

5. Táblázat: Anomer α -aminosavat tartalmazó származékok szintézise

Vegyület (kiind. a.)	R	R'	Reakciókörülmények	Izolált termék(ek) (%)
73	-	-	ld. a 9. ábrán	74 (71); 75 (66); 76 (73)
74	CH ₂ CO ₂ Me	-	ld. a 9. ábrán	77 (65)
			Ag ₂ CO ₃ , CH ₃ CN, r. t., sötétben	80 (65)
75	CH ₂ CO ₂ Bn	-	ld. a 9. ábrán	78 (87)
			Ag ₂ CO ₃ , CH ₃ NO ₂ , BnOCONHCH ₂ CN, r. t. sötétben	81 (29)
76	CH(CH ₃)CO ₂ Me	-	ld. a 9. ábrán	79 (66)
			Ag ₂ CO ₃ , CH ₃ CN, r. t. sötétben	82 (43)
77	CH ₂ CO ₂ Me	-	ld. a 9. ábrán	83 (79)
			Me ₃ P, AcCl, CH ₂ Cl ₂ , -20 °C - r. t.	85 (24); 89 (10)
			Me ₃ P, Ac ₂ O, CH ₂ Cl ₂ , -20 °C - r. t.	85 (51)
			Me ₃ P, AcOH, CH ₂ Cl ₂ , -20 °C - r. t.	85 (29)
			Me ₃ P, HO ₂ CH(CH ₃)NHCO ₂ tBu, CH ₂ Cl ₂ , -20 °C - r. t.	90 (44)
78	CH ₂ CO ₂ Bn	-	ld. a 9. ábrán	84 (67)
			Me ₃ P, HO ₂ CH(CH ₃)NHCO ₂ tBu, CH ₂ Cl ₂ , r. t.	91 (33)
79	CH(CH ₃)CO ₂ Me	-		
80	CH ₂ CO ₂ Me	CH ₃	ld. a 9. ábrán	85 (55)
81	CH ₂ CO ₂ Me	CH ₂ NHCO ₂ Bn	ld. a 9. ábrán	86 (27)
82	CH(CH ₃)CO ₂ Me	CH ₃	ld. a 9. ábrán	87 (29)
83	CH ₂ CO ₂ Me	-	AcCl, piridin, r. t.	85 (15); 89 (15)
			HO ₂ CCH ₂ NHCO ₂ Bn, DCC, CH ₂ Cl ₂ , r. t.	86 (42)
84	CH ₂ NHCO ₂ Bn	-	HO ₂ CCH ₂ NHCO ₂ Bn, DCC, CH ₂ Cl ₂ , r. t.	87 (31)
85	CH ₂ CO ₂ Me	CH ₃		
86	CH ₂ CO ₂ Me	CH ₂ NHCO ₂ Bn		
87	CH ₂ CO ₂ Bn	CH ₂ NHCO ₂ Bn		
88	CH(CH ₃)CO ₂ Me	CH ₃		
89	CH ₂ CO ₂ Me	CH ₃		
90	CH ₂ CO ₂ Me	CH(CH ₃)NHCO ₂ tBu		
91	CH ₂ CO ₂ Bn	CH(CH ₃)NHCO ₂ tBu		

7. Az új vegyületekkel elkészült enzimkinetikai és krisztallográfiai vizsgálatok fontosabb eredményeit az előző pontokban ismertettük.

A glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoin akarbózzal végzett enzimkatalizált transzglykozilezésével egy új, tetraszacharid jellegű spiro-tiohidantoint állítottunk elő, amely a nyál amilázt az akarbóznál négyszer jobban gátolta.³⁵

A glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoin (TH) *in vivo* hatékonyságát Wistar patkányokon streptozotocinnal (STZ) indukált hiperglikémiás körülmények között hiperinzulinémiás (INS) euglikémiás glükóz-clamp módszerrel vizsgálták. Megállapították, hogy a vegyület *in vivo* vércukorszint-csökkentő hatású. A legfontosabb eredményeket összegző ábrákat mellékeljük.³⁶

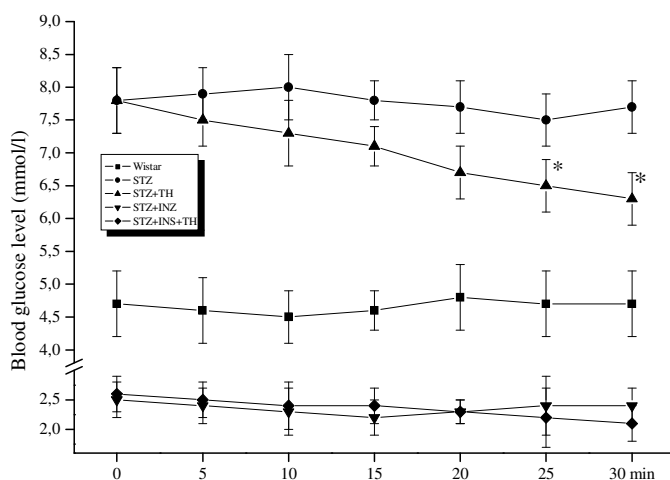


Figure 2. The hypoglycaemic action of thiohydantoin (100 mg/kg) on fasting blood glucose level after its intravenous administration. * indicate significant difference from its control value obtained just before (0 min) the intravenous administration of thiohydantoin.

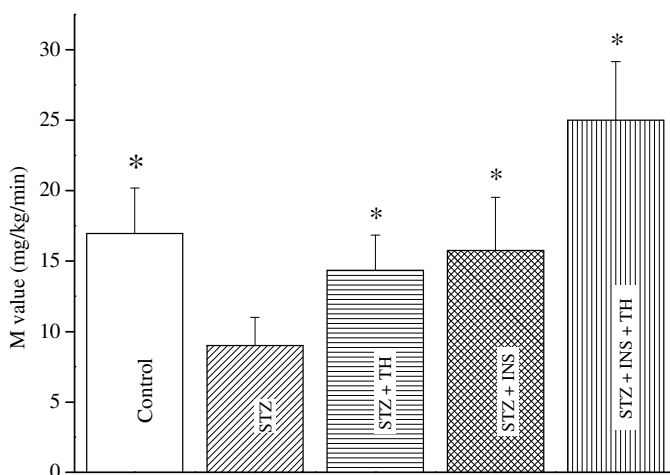


Figure 3. The effect of thiohydantoin (100 mg/kg i.v.) administration 30 before the commencement of clamp procedure on the whole body insulin sensitivity as determined by hyperinsulinaemic euglycaemic glucose clamping. * means statistically significant different from the streptozotocin-induced diabetic rats (STZ) at $P \leq 0.05$.

C-(β -D-Glükopiranozil)-heterociklusok (benzimidazol, benzotiazol, 1,3,4-oxadiazol) kötődésének szerkezeti sajátosságait együttműködő partnereinkkel protein krisztallográfiai módszerekkel vizsgálva a glikogén foszforiláz enzim egy új kötőhelyét fedeztük fel, amely a benzimidazol gyűrű szelektív kapcsolására alkalmas.³⁷

Felkérésre könyvfejezetben foglaltuk össze a glikogén foszforiláz enzimek glükóz analóg inhibitoraival kapcsolatos ismereteket,³⁸ illetve újabb megkeresések alapján a glikogén foszforiláz gátlásának az antidiabetikus terápiában nyíló lehetőségeit összegeztük.^{39, 40}

Publikációk, hivatkozások

A munka eredményeiről eddig 7 közleményünk jelent meg/van nyomdában (az irodalomjegyzék 6., 18., 21., 28., 35., 37., 38. tételei). Egy összefoglaló (39.) elfogadás, egy újabb áttekintő cikk (40.) beküldés előtt áll. További 7 eredeti közlemény (2., 3., 9., 10., 15., 27., 36.) szintetikus és enzimológiai része elkészült, a krisztallográfiai vizsgálatok leírásának hozzáadása után küldjük be őket közlésre. Hazai és nemzetközi rendezvényeken 31 előadást/poszttert tartottunk/mutattunk be (ld. a jelentés végén). A megjelent munkákra eddig 27 hivatkozás érkezett.

A pályázat témájához kapcsolódó értekezések, dolgozatok:

Doktori (PhD) értekezések (fokozatszerzés éve)

CZIFRÁK KATALIN – *Anomer α -aminosav tartalmú oligopeptidek előállítása* (2005)

HADADY ZSUZSA – *Szintetikus vizsgálatok glikogén foszforiláz inhibitorok szerkezet-hatás összefüggéseinek felderítésére* (2007)

FELFÖLDI NÓRA – Doktori tanulmányai után abszolutóriumot szerzett 2007-ben. Dolgozata összeállítás alatt áll.

Diplomamunkák (védés éve)

VERES EDIT – *Új módszer 2,2,2-triklóretil- és 2,2,2-triklóretoxikarbonil védőcsoportok eltávolítására* (2004)

BERZSÉNYI ESZTER – *Várhatóan glikoenzim gátló sajátságú szacharid származékok előállítása* (2005) **A Magyar Kémikusok Egyesülete Nívódíjával kitüntetve**

TELEPÓ KATALIN – *N-Acil-N'- β -D-glükopiranozil-karbamid típusú glikogén foszforiláz inhibitorok előállítása* (2006)

KÓNYA BÁLINT – *Glikogén foszforiláz inhibitorok előállítása és enzimkinetikai vizsgálata* (2007)

HÜSE CSABA – *Glükopiranozil tiokarbamidok, mint glikogén foszforiláz inhibitorok előállítása* (2007)

OTDK dolgozatok

KÓNYA BÁLINT – *Glükopiranozil-karbamid típusú glikogén foszforiláz inhibitorok előállítása* (2007)

HÜSE CSABA – *N-(β -D-glükopiranozil)-N'-aril- illetve acil-tiokarbamidok, mint potenciális antidiabetikumok előállítása* (2007)

A kutatási téma további lehetséges irányai, hasznosítási lehetőségek

A glikogén foszforiláz enzim gátlószereinek, mint potenciális antidiabetikumoknak a fejlesztése iránt jelentős nemzetközi érdeklődés mutatkozik, ezért ezen a területen további vizsgálatokat tervezünk: molekulamodellezéssel és kémiai dokkolásokkal támogatva az acil-karbamidok új generációját tervezzük meg és állítjuk elő; a glükopiranozilidén-spiroheterociklusok továbbfejlesztése is ígéretes; az acil-karbamidok vezérszerkezetként való alkalmazásával nagyobb kémiai stabilitású nem klasszikus bioizosztérek készíthetők. Ezek a vegyületek megfelelő biológiai aktivitás és farmakokinetikai tulajdonságok esetén gyógyszerfejlesztés kiinduló pontjai lehetnek.

A glikozidázgátlók (glükozidáz, galaktozidáz, amiláz) területe szintén ígéretes lehetne, azonban a hazai kooperációs partnerek nyugdíjazása és kutatási lehetőségeik megszűnése miatt ez a terület a közeljövőben kisebb érdeklődést kap csoportunkban.

Debrecen, 2008. február 26.

Dr. Somsák László
egyetemi tanár
témavezető

Irodalom

1. Oikonomakos, N. G.; Kosmopolou, M.; Zographos, S. E.; Leonidas, D. D.; Somsák, L.; Nagy, V.; Praly, J.-P.; Docsa, T.; Tóth, B.; Gergely, P. Binding of *N*-acetyl-*N'*- β -D-glucopyranosyl urea and *N*-benzoyl-*N'*- β -D-glucopyranosyl urea to glycogen phosphorylase *b*: Kinetic and crystallographic studies. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 1684-1696.
2. Nagy, V.; Felföldi, N.; Praly, J.-P.; Docsa, T.; Gergely, P.; Chrysina, E. D.; Tiraidis, C.; Alexacou, K. M.; Leonidas, D. D.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G.; Somsák, L. *N*-(4-substituted-benzoyl)-*N'*-(β -D-glucopyranosyl) ureas, inhibitors of glycogen phosphorylase: synthesis, kinetic and crystallographic evaluation. *in preparation*.
3. Chrysina, E. D.; Nagy, V.; Felföldi, N.; Telepó, K.; Praly, J.-P.; Docsa, T.; Gergely, P.; Alexacou, K. M.; Leonidas, D. D.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G.; Somsák, L. Synthesis, kinetic and crystallographic evaluation of *N*-acyl-*N'*-(β -D-glucopyranosyl)ureas, nanomolar glucose analogue inhibitors of glycogen phosphorylase, potential antidiabetic agents. *in preparation*.
4. Pintér, I.; Kovács, J.; Tóth, G. Synthesis of sugar ureas via phosphinimines. *Carbohydr. Res.* **1995**, *273*, 99-108.
5. Helferich, B.; Kosche, W. Über Verbindungen von Aldosen mit Harnstoff und ihre Verwendung zur Synthese stickstoff-haltiger Glucoside. *Chem. Ber.* **1926**, *59*, 69-79.
6. Somsák, L.; Felföldi, N.; Kónya, B.; Hüse, C.; Telepó, K.; Bokor, É.; Czifrák, K. Assessment of synthetic methods for the preparation of *N*- β -D-glucopyranosyl-*N'*-substituted ureas, -thioureas and related compounds. *Carbohydr. Res.* **2008**, invited paper, accepted for publication. DOI: 10.1016/j.carres.2008.01.045.
7. Likhoshervostov, L. M.; Novikova, O. S.; Shibaev, V. N. New efficient synthesis of beta-glucosylamines of mono- and disaccharides with the use of ammonium carbamate. *Dokl. Chem.* **2002**, *383*, 89-92.
8. Hackenberger, C. P. R.; O'Reilly, M. K.; Imperiali, B. Improving glycopeptide synthesis: A convenient protocol for the preparation of beta-glycosylamines and the synthesis of glycopeptides. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 3574-3578.
9. Felföldi, N.; Nagy, V.; Docsa, T.; Gergely, P.; Chrysina, E. D.; Alexacou, K. M.; Leonidas, D. D.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G.; Somsák, L. Structure-activity relationships of glucose analogue inhibitors of glycogen phosphorylase: role of the linker between glucose and aromatic ring in *N*-acyl- β -D-glucopyranosylamine and β -D-glucopyranosyl urea type compounds. *in preparation*.
10. Felföldi, N.; Docsa, T.; Gergely, P.; Chrysina, E. D.; Oikonomakos, N. G.; Somsák, L. Structure-activity relationships of glucose analogue inhibitors of glycogen phosphorylase: role of the sugar configuration in binding to the catalytic vs. the new allosteric site. *in preparation*.
11. Watson, K. A.; Mitchell, E. P.; Johnson, L. N.; Cruciani, G.; Son, J. C.; Bichard, C. J. F.; Fleet, G. W. J.; Oikonomakos, N. G.; Kontou, M.; Zographos, S. E. Glucose Analogue Inhibitors of Glycogen Phosphorylase: from Crystallographic Analysis to Drug Prediction using GRID Force-Field and GOLPE Variable Selection. *Acta Cryst.* **1995**, *D51*, 458-472.
12. Somsák, L.; Kovács, L.; Tóth, M.; Ósz, E.; Szilágyi, L.; Györgydeák, Z.; Dinya, Z.; Docsa, T.; Tóth, B.; Gergely, P. Synthesis of and a Comparative Study on the Inhibition of Muscle and Liver Glycogen Phosphorylases by Epimeric Pairs of D-Gluco- and D-Xylopyranosylidene-spiro-(thio)hydantoin and *N*-(D-Glucopyranosyl) Amides. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2843-2848.

13. Györgydeák, Z.; Hadady, Z.; Felföldi, N.; Krakomperger, A.; Nagy, V.; Tóth, M.; Brunyánszky, A.; Docsa, T.; Gergely, P.; Somsák, L. Synthesis of *N*-(β -D-glucopyranosyl)- and *N*-(2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl) amides as inhibitors of glycogen phosphorylase. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 4861-4870.
14. Hadady, Z. Szintetikus vizsgálatok glikogén foszforiláz inhibitorok szerkezet-hatás összefüggéseinek felderítésére. *PhD értekezés, Debreceni Egyetem*, **2007**.
15. Czifrák, K.; Felföldi, N.; Docsa, T.; Gergely, P.; Chrysina, E. D.; Kiritsi, C.; Siafaka-Kapadai, A.; Leonidas, D. D.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G.; Somsák, L. Tracking structure-activity relationships of glycogen phosphorylase inhibitors: synthesis, kinetic and crystallographic evaluation of analogues of *N*-acyl-*N'*-(β -D-glucopyranosyl)ureas. *in preparation*.
16. Krülle, T. M.; Fuente, C.; Watson, K. A.; Gregoriou, M.; Johnson, L. N.; Tsitsanou, K. E.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G.; Fleet, G. W. J. Stereospecific Synthesis of Spirohydantoins of D-Glucopyranose: Inhibitors of Glycogen Phosphorylase. *Synlett* **1997**, 211-213.
17. Watson, K. A.; Chrysina, E. D.; Tsitsanou, K. E.; Zographos, S. E.; Archontis, G.; Fleet, G. W. J.; Oikonomakos, N. G. Kinetic and crystallographic studies of glucopyranose spirohydantoin and glucopyranosylamine analogs inhibitors of glycogen phosphorylase. *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* **2005**, *61*, 966-983.
18. Czifrák, K.; Kovács, L.; Kövér, K. E.; Somsák, L. Synthesis of some derivatives of C-(1-deoxy-1-*N*-substituted-D-glucopyranosyl)formic acid (D-gluco-hept-2-ulopyranosonic acid) as potential inhibitors of glycogen phosphorylase. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 2328-2334.
19. Oikonomakos, N. G.; Skamnaki, V. T.; Tsitsanou, K. E.; Gavalas, N. G.; Johnson, L. N. A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions. *Structure* **2000**, *8*, 575-584.
20. Rath, V. L.; Ammirati, M.; Danley, D. E.; Ekstrom, J. L.; Gibbs, E. M.; Hynes, T. R.; Mathiowetz, A. M.; McPherson, R. K.; Olson, T. V.; Treadway, J. L.; Hoover, D. J. Human liver glycogen phosphorylase inhibitors bind at a new allosteric site. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 677-682.
21. Somsák, L.; Czifrák, K.; Veres, E. Selective removal of 2,2,2-trichloroethyl- and 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl protecting groups with Zn-N-methylimidazole in the presence of reducible and acid sensitive functionalities. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 9095-9097.
22. Bichard, C. J. F.; Mitchell, E. P.; Wormald, M. R.; Watson, K. A.; Johnson, L. N.; Zographos, S. E.; Koutra, D. D.; Oikonomakos, N. G.; Fleet, G. W. J. Potent Inhibition of Glycogen Phosphorylase by a Spirohydantoin of Glucopyranose: First Pyranose Analogues of Hydantocidin. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 2145-2148.
23. Fuente, C.; Krülle, T. M.; Watson, K. A.; Gregoriou, M.; Johnson, L. N.; Tsitsanou, K. E.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G.; Fleet, G. W. J. Glucopyranose Spirohydantoins: Specific Inhibitors of Glycogen Phosphorylase. *Synlett* **1997**, 485-487.
24. Somsák, L.; Nagy, V.; Docsa, T.; Tóth, B.; Gergely, P. Gram-scale synthesis of a glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin and its effect on hepatic glycogen metabolism studied in vitro and in vivo. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 405-408.
25. Gregoriou, M.; Noble, M. E. M.; Watson, K. A.; Garman, E. F.; Krülle, T. M.; Fuente, C.; Fleet, G. W. J.; Oikonomakos, N. G.; Johnson, L. N. The structure of a glycogen phosphorylase glucopyranose spirohydantoin complex at 1.8 Å resolution and 100 K: The role of the water structure and its contribution to the binding. *Protein Sci.* **1998**, *7*, 915-927.

26. Oikonomakos, N. G.; Skamnaki, V. T.; Ósz, E.; Szilágyi, L.; Somsák, L.; Docsa, T.; Tóth, B.; Gergely, P. Kinetic and crystallographic studies of glucopyranosylidene spirothiohydantoin binding to glycogen phosphorylase b. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 261-268.
27. Nagy, V.; Vidal, S.; Benlifa, M.; Berzsényi, E.; Teilhet, C.; Czifrák, K.; Batta, G.; Docsa, T.; Gergely, P.; Somsák, L.; Praly, J. P. Carbohydrate-based spiro-heterocycles for the inhibition of glycogen phosphorylase: D-Glucopyranosylidene-spiro-oxathiazoles as new nanomolar inhibitors. *in preparation*.
28. Elek, R.; Kiss, L.; Praly, J. P.; Somsák, L. β -D-Galactopyranosyl-thiohydroximates and D-galactopyrano-sylidene-spiro-oxathiazoles: synthesis and enzymatic evaluation against E. coli D-galactosidase. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 1397-1402.
29. Hopfinger, A. J.; Reaka, A.; Venkatarangan, P.; Duca, J. S.; Wang, S. Construction of a virtual high throughput screen by 4D-QSAR analysis: Application to a combinatorial library of glucose inhibitors of glycogen phosphorylase b. *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* **1999**, *39*, 1151-1160.
30. Knapp, S.; Darout, E.; Amorelli, B. New glycomimetics: Anomeric sulfonates, sulfenamides, and sulfonamides. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1380-1389.
31. Praly, J. P.; Descotes, G. Free-radical halogenation of a phenylthio- β -glucoside and of its oxidized derivatives. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1133-1136.
32. Somsák, L.; Sós, E.; Györgydeák, Z.; Praly, J.-P.; Descotes, G. Synthesis and Some Transformations of 1-Cyano-glycopyranosyl Azides " Precursors of Anomeric α -Amino Acids. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 9121-9136.
33. Czifrák, K.; Szilágyi, P.; Somsák, L. Anomeric α -azido acid (2-azido-2-deoxy-hept-2-ulopyranosonic acid) derivatives en route to peptides incorporating sugar amino acids. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 127-141.
34. Gyóllai, V.; Somsák, L.; Szilágyi, L. N-(1-Cyano-D-glycosyl)amides - Novel Anomeric α -Amino Acid Derivatives. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 3969-3972.
35. Kandra, L.; Remenyik, J.; Batta, G.; Somsák, L.; Gyémánt, G.; Park, K. H. Enzymatic synthesis of a new inhibitor of α -amylases: acarviosinyl-isomaltosyl-spiro-thiohydantoin. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 1311-1317.
36. Docsa, T.; Peitl, B.; Hüse, C.; Somsák, L.; Szilvássy, Z.; Gergely, P. Glucose analog inhibitor of glycogen phosphorylase as potential antidiabetics. *in preparation*.
37. Chrysina, E. D.; Kosmopolou, M. N.; Tiraidis, C.; Kardarakis, R.; Bischler, N.; Leonidas, D. D.; Hadady, Z.; Somsák, L.; Docsa, T.; Gergely, P.; Oikonomakos, N. G. Kinetic and crystallographic studies on 2-(β -D-glucopyranosyl)-5-methyl-1,3,4-oxadiazole, -benzothiazole, and -benzimidazole, inhibitors of muscle glycogen phosphorylase b. Evidence for a new binding site. *Protein Sci.* **2005**, *14*, 873-888.
38. Somsák, L.; Nagy, V.; Hadady, Z.; Felföldi, N.; Docsa, T.; Gergely, P. Recent developments in the synthesis and evaluation of glucose analog inhibitors of glycogen phosphorylases as potential antidiabetic agents. In *Frontiers in Medicinal Chemistry*, Reitz, A. B.; Kordik, C. P.; Choudhary, M. I.; Rahman, A. u., Eds. Bentham: 2005; Vol. 2, pp 253-272.
39. Oikonomakos, N. G.; Somsák, L. Recent advances in glycogen phosphorylase inhibitor design. *Curr. Opin. Invest. Drugs* **2008**, *invited review*, submitted.
40. Somsák, L.; Czifrák, K.; Tóth, M.; Bokor, É.; Chrysina, E. D.; Alexacou, K. M.; Leonidas, D. D.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G. New inhibitors of glycogen phosphorylase as potential antidiabetic agents. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *invited review in preparation*.

Előadások/Poszterek

1. L. Somsák:
Structure-activity relationships among glycogen phosphorylase inhibitors
First German-Hungarian Workshop – Chemical Diversity of Natural Products – Synthesis, Characterization and Applications, July 5-6, 2004, Hannover.
2. L. Somsák:
Glucose analog inhibitors of glycogen phosphorylases
Université de Picardie Jules Verne, Amiens, Sep 3rd, 2004.
3. Czifrák K., Somsák L.:
Sztereoselektív szintézisutak anomer α -aminosavat tartalmazó oligopeptidek előállítására
MTA Szénhidrátkémiai Munkabizottság előadóülése, Debrecen, 2004. november 5.
4. Felföldi N., Hadady Zs., Nagy V., Docsa T., Gergely P., Somsák L.:
Szintetikus vizsgálatok glikogén foszforiláz inhibitorok szerkezet–hatás összefüggéseinek felderítésére
MTA Szénhidrátkémiai Munkabizottság előadóülése, Debrecen, 2004. november 5.
5. Z. Györgydeák, Zs. Hadady, N. Felföldi, L. Somsák:
N- β -D-Glucopyranosyl Amides and their Urea Analogs as Inhibitors of Glycogen Phosphorylase
Glycostructures in Biological Systems XIII – Symposium of the Resource Center 470, University of Hamburg, Dec 1-3, 2004, Germany, G4.
6. K. Czifrák, L. Somsák:
Stereoselective synthesis of oligopeptides incorporating anomERICALLY fused sugar glycines
2nd Austrian-Hungarian Carbohydrate Conference, Somogyaszaló, 2005. május 24-26.
7. N. Felföldi, Zs. Hadady, K. Czifrák, T. Docsa, P. Gergely, L. Somsák:
Synthesis and evaluation of new glucose derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase
2nd Austrian-Hungarian Carbohydrate Conference, Somogyaszaló, 2005. május 24-26.
8. Czifrák K., Somsák L.:
Anomer α -aminosavat tartalmazó oligopeptidek előállítása
MKE Vegyészkonferencia, Hajdúszoboszló, 2005. június 28-30. P-10, 60. o.
9. Felföldi N., Hadady Zs., Somsák L., Docsa T., Gergely P.:
Glikogén foszforiláz inhibitorok szerkezet-hatás összefüggéseinek vizsgálata
MKE Vegyészkonferencia, Hajdúszoboszló, 2005. június 28-30. P-22, 72. o.
10. Remenyik J., Kandra L., Gyémánt Gy., Batta Gy., Somsák L., Park K. H., Lipták A.:
Bacillus stearothermophilus maltogén amiláz (BSMA) katalizálta glikozilezések
MKE Vegyészkonferencia, Hajdúszoboszló, 2005. június 28-30. P-77, 127. o.
11. L. Somsák:
Glycomimetics: New syntheses, improved biological activities
13th European Carbohydrate Symposium, Bratislava, Slovakia, August 21-26, 2005, PL4.
(Plenáris előadás)
12. N. Felföldi, Zs. Hadady, T. Docsa, P. Gergely, L. Somsák:
Glycogen phosphorylase inhibitors: structure-activity relationships of N-glucopyranosyl urea type compounds
13th European Carbohydrate Symposium, Bratislava, Slovakia, August 21-26, 2005, P146.
13. Somsák L.:
Glikomimetikumok: szénhidrátok gyökös brómozásától a potenciális antidiabetikumokig
MTA Kémiai Tudományok Osztálya, Felolvasóülés, Budapest, 2005. október 18.

14. K. Czifrák, L. Somsák:
Stereoselective Synthesis of Oligopeptides Incorporating Anomerically Fused Sugar Glycines
 2nd German-Hungarian Workshop, University of Debrecen, April 4-9, 2006, YS02, p. 10.
15. L. Somsák:
Recent Developments in the Inhibition of Glycogen Phosphorylase as a Potential Antidiabetic Therapy
 2nd German-Hungarian Workshop, University of Debrecen, April 4-9, 2006, KnL04, p. 21.
16. N. Felföldi, Zs. Hadady, T. Docsa, P. Gergely, L. Somsák:
Structure-activity studies among glycogen phosphorylase inhibitors
 2nd German-Hungarian Workshop, University of Debrecen, April 4-9, 2006, P08, p. 45.
17. L. Somsák:
Progress in the inhibition of glycogen phosphorylase: the last three years
 MTA Kém. Tud. Oszt., Szénhidrátkémiai Munkabizottság előadóülése, Mátrafüred, 2006. május 31.-jún. 2.
18. K. Czifrák, L. Somsák, T. Docsa, P. Gergely:
Anomerically bifunctional derivatives of D-glucose as inhibitors of glycogen phosphorylase
 MTA Kém. Tud. Oszt., Szénhidrátkémiai Munkabizottság előadóülése, Mátrafüred, 2006. május 31.-jún. 2.
19. N. Felföldi, K. Telepó, K. Czifrák, L. Somsák:
Studies on the synthesis of N-acyl-N'-β-D-glucopyranosyl ureas and related compounds
 MTA Kém. Tud. Oszt., Szénhidrátkémiai Munkabizottság előadóülése, Mátrafüred, 2006. május 31.-jún. 2.
20. L. Somsák, N. Felföldi, K. Czifrák, É. Bokor, K. Telepó, Cs. Hüse, T. Docsa, P. Gergely, E.D. Chrysina, C. Tiraidis, N. G. Oikonomakos:
Synthesis and Evaluation of New Glucose Analog Inhibitors of Glycogen Phosphorylase
 XXIIIrd International Carbohydrate Symposium, Whistler, Canada, July 23-28, 2006, TUE-PS.50, p. 169.
21. L. Somsák:
Radical-mediated bromination of carbohydrates: New possibilities for the synthesis of glycomimetics
 Université Claude Bernard Lyon 1, CPE Lyon, Sep 18, 2006.
22. M. Tóth, D. Mucs, I. Tvaroška, L. Somsák:
New structures as potential glycoenzyme inhibitors
 MTA Kém. Tud. Oszt., Szénhidrátkémiai Munkabizottság előadóülése, Mátrafüred, 2007. május 23.-25.
23. L. Somsák, K. Telepó, B. Kónya, Cs. Hüse, N. Felföldi, K. Czifrák:
Comparative evaluation of synthetic methods for N-substituted-N'-β-D-glucopyranosyl ureas
 MTA Kém. Tud. Oszt., Szénhidrátkémiai Munkabizottság előadóülése, Mátrafüred, 2007. május 23.-25.
24. Docsa T., Hüse Cs., Somsák L., Németh J., Döbrönte R., Szilvássy Z., Peitl B., Gergely P.:
Glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoin hatása az inzulin érzékenységre
 Magyar Biokémiai Egyesület 2007. évi Vándorgyűlése, Debrecen, 2007. augusztus 26.-29.

25. L. Somsák, É. Bokor, K. Telepó, B. Kónya, Cs. Hüse, T. Docsa, P. Gergely, E. D. Chrysina, D. D. Leonidas, S. E. Zographos, N. G. Oikonomakos:
Searching for new glucose derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase, potential antidiabetic agents
14th European Carbohydrate Symposium, Lübeck, Germany, Sep 2-7, 2007. Oral presentation, OP 103, p. 157.
26. M. Tóth, D. Mucs, I. Tvaroška, L. Somsák:
Testing new structures as potential inhibitors of glycoenzymes
14th European Carbohydrate Symposium, Lübeck, Germany, Sep 2-7, 2007. PO 067, p. 255.
27. L. Somsák:
Glucose analogue inhibitors of glycogen phosphorylase: syntheses and structure-activity relationships
Universität Potsdam, Sep 7, 2007.
28. Somsák L.: *Cukorszármaezékok, mint potenciális antidiabetikumok*
Tudományos ülésszak a Magyar Tudomány Ünnepe 2007 rendezvénysorozat keretében, Debrecen, 2007. nov. 7.

További előadások:

29. L. Somsák, V. Nagy, N. Felföldi, K. Czifrák, T. Docsa, P. Gergely, N. G. Oikonomakos:
Glucose analog inhibitors of glycogen phosphorylase as potential antidiabetic agents
Ist HUNGARIAN-SINGAPOREAN WORKSHOP on DRUG DISCOVERY and BIOMATERIALS (Hungarian Academy of Sciences, Budapest, March 10-11, 2008)
30. M. Tóth, D. Mucs, I. Tvaroška, L. Somsák:
Potential glycoenzyme inhibitors predicted by in silico studies
Third German-Hungarian Workshop – Synthesis, Isolation, and Biological Activity of Natural Products, Paderborn 15-17. Mai 2008, Germany
31. K. Czifrák, E. Berzsényi, N. Felföldi, Sz. Deák, B. Kónya, S. Vidal, J.-P. Praly, L. Somsák:
New glucose derived spiro-heterocycles as potential inhibitors of glycogen phosphorylase
Third German-Hungarian Workshop – Synthesis, Isolation, and Biological Activity of Natural Products, Paderborn 15-17. Mai 2008, Germany